

Untersuchungen über die Bindung von Bilirubin
an die intrazellulären Proteine am Beispiel
der löslichen Herzmuskelproteine.

Elisabeth Schmutterer, geb. Scharnagl

1970

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

U n t e r s u c h u n g e n ü b e r d i e
B i n d u n g v o n B i l i r u b i n
a n d i e i n t r a z e l l u l ä r e n
P r o t e i n e a m B e i s p i e l d e r
l ö s l i c h e n H e r z m u s k e l p r o t e i n e

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Elisabeth Schmutterer, geb. Scharnagl

aus

Maising

Jahr

1969

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. NOWY

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. SEITZ

Dekan: Prof. Dr. KRAFT

Tag der mündlichen Prüfung: 14. April 1970



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. DURCHFÜHRUNG DER UNTERSUCHUNGEN	2
1. Gewinnung des Herzmuskelextraktes	2
a) Verarbeitung des Rohmaterials	2
b) Homogenisation	3
c) Ultrafiltration	3-4
2. Gewinnung der isolierten Eiweißfraktionen des Herzmuskelextraktes	4-5
3. Anreicherung des Herzmuskelextraktes und der isolierten Fraktionen mit Bilirubin	5-6
4. Vorbereitung des Versuchsmaterials zur präparativen Elektrophorese	6
5. Durchführung der präparativen Elektrophorese	6-7
6. Immunoelektrophoretische Untersuchungen	7-8
7. Sephadex-Gel-Filtration	8-9
8. Lipoproteinfärbung	9
III. ERGEBNISSE	10
1. Vergleich der Lösungsmittel DMSO und Äthanol	10-13
2. Auftrennung des mit Bilirubin angereicherten Kalbsmyocards	13-15
3. Elektrophoretische Untersuchungen mit den getrennten Fraktionen	15-17
4. Ergebnis der Lipoproteinfärbung	17
5. Immunoelektrophoretische Untersuchungen	17
6. Abschätzung des Molekulargewichtes mittels Sephadex-Gel-Filtration	17-19

	Seite
IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	20-28
V. ZUSAMMENFASSUNG	29
LITERATURNACHWEIS	30-35
LEBENS LAUF	36

I. EINLEITUNG

Der Bilirubin-Stoffwechsel stellt in seinen biochemischen Grundlagen und deren klinischen Deutung noch immer ein umstrittenes Gebiet dar. Durch die Zerstörung der Erythrozyten in der Milz bzw. im RES zerfällt das Hämoglobin in Globin, einen eisenhaltigen und einen eisenfreien Teil. Das Globin wird fermentativ in Aminosäuren zerlegt, die für weiteren Eiweißaufbau zur Verfügung stehen. Das eisenhaltige Hämosiderin wird zu Ferritin oxydiert, der physiologischen Transportform des Eisens. Der Porphyrinring des Hämatoidins, das außer aus Hämoglobin aus Myoglobin und Zytochromen stammt, wird zu Biliverdin aufgespalten, das unter Aufnahme von 2 H-Atomen zu Bilirubin oxydiert wird. Obwohl im letzten Jahrzehnt zahlreiche neue Erkenntnisse über Bildung und Transport des Bilirubins gewonnen wurden, sind verschiedene Fragen bezüglich des Abbaues und der intrazellulären Ablagerung noch offen. In der vorliegenden Arbeit soll die Bindung von Bilirubin an die zellulären Proteine am Beispiel der löslichen Herzmuskelproteine untersucht werden.

II. METHODIK

Die Versuche wurden mit Kalbsherzextrakt und mit einzelnen Fraktionen des Kalbsmyocards durchgeführt.

1. Gewinnung des Herzmuskelextraktes

a) Verarbeitung des Rohmaterials

Um die Proteine für die Experimente möglichst unverändert zu erhalten, wurde im Schlachthof ein noch schlagendes Kalbsherz in eine Nährlösung aus 4 Litern Tyrode I, 1 Liter Tyrode II und physiologischer Kochsalzlösung gelegt, die auf 37° C angewärmt war. Durch Massage wurde das Blut aus den Vorhöfen, Kammern und grösseren Gefässen gepresst. Zur vollständigen Entfernung von Blutspuren wurde ein Perfusionsbehälter an die Aorta angeschlossen, wobei die zuführenden Venen und die Pulmonalarterie unterbunden waren. Diese Spülung wurde solange fortgesetzt, bis die Nährlösung klar, d.h. blutlos, war. Unmittelbar darauf wurde das Kalbsherz in flüssigem Stickstoff bei -196° C eingefroren.

Im Kühlschrank wurde das tiefgefrorene Kalbsherz bis zu einer Temperatur von 4° C aufgetaut; auf die Beibehaltung dieser Temperatur wurde bei den weiteren Arbeitsgängen sorgfältig geachtet. Anschließend wurden Fettgewebe, Klappen, Sehnen und Bindegewebe abpräpariert und das verbleibende Muskelgewebe in Würfel geschnitten, sodann mit aqua bidestillata von 4° C im Verhältnis 1 : 2 (Gewebe : Lösung) versetzt.

b) Homogenisation

Dieses Gemisch wurde 1 - 2 Minuten in einen Homogenisator der Bauart Waring-Blendor gegeben, der ein Homogenisieren unter Kühlung ermöglicht. Um die bei niedriger Salzkonzentration löslichen Substanzen zu gewinnen, wurde das Homogenat 17 Stunden - zur Schonung der Eiweißkörper im Kühlschrank - extrahiert, in der Kühlzentrifuge bei 0°C 20 (zwanzig) Minuten bei 3000 Upm vorzentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet, das Sediment mit dem gleichen Volumen aqua bidestillata versetzt und nochmals 10 Minuten bei 0°C und 3000 Upm zentrifugiert. Zur endgültigen Abtrennung nicht löslichen Materials wurde der Extrakt in die Ultrazentrifuge gegeben (Firma Beckmann, Modell Spinco Rotor R 50, Temp. = 0 bis -3°C , Dauer 120 Minuten, 28 000 Upm).

c) Ultrafiltration

Die Trennung der niedermolekularen Bestandteile von den Proteinen und die Erhöhung des Eiweißgehaltes erfolgte mittels Ultrafiltration mit einem Modell der Fa. LKB Stockholm. Der ganze Arbeitsgang wurde in einer Wanne, die mit Eisstücken gefüllt war, durchgeführt. Der hierbei benutzte Dialysenschlauch (Typ Visking 36 DC) hat einen Porenradius von $24 \text{ \AA}$; durch diese Membran können nur gelöste Stoffe mit einem Molekulargewicht unter 30 000 und das Lösungsmittel in den Filter dringen. Auf diese Weise werden außen die größeren Moleküle, im vorliegenden Fall die Proteine, angereichert. Um einen noch höheren Eiweißgehalt, etwa von 5 g%, zu erhalten, wurde der Extrakt im Kühlschrank mit Polyäthylenglykol (Entwicklungslabor Serva Heidelberg) eingeengt.

Anschließend wurde der konzentrierte Kalbsherzextrakt eingefroren.

2. Gewinnung der isolierten Eiweißfraktion des Herzmuskelextraktes

Ein Teil des Vollextraktes wurde weiterverarbeitet, um die einzelnen Elektrophoretischen Fraktionen des Myocards zu erhalten. Dazu wurde das Material einer Trennung in der trägerfreien Elektrophorese unterzogen (Elphor-VAP, Firma Bender und Hobein München; techn. Daten: 2,1 kV, 140 mA, 4° C, Dosierpumpe 1, Auftragsstelle 1, 7 Upm, alle 18 min. absaugen, Automatik, Tris-EDTA-Puffer 2:1 verdünnt. Tris-EDTA-Puffer Tris 605,0, EDTA 60,0, Borsäure 46,0, Aqu. dest. ad 10 l). Der Vorteil dieser Apparatur besteht in einer breiten Auftrennung unter hoher Spannung, wobei das Material in 48 Gläsern aufgefangen wird. Da die trägerfreie Elektrophorese als Trägermedium nicht Papier, sondern nur Puffer benutzt, bleibt das Material in seiner Menge erhalten und steht somit für weitere Versuche zur Verfügung. Nach Abschluß dieser Elektrophorese wurde das Puffer-Herzextrakt-Gemisch in den einzelnen Auffanggläschen mit Polyäthylenglykol auf eine Konzentration von ca. 5 g% Eiweißgehalt eingengt. Der Inhalt eines jeden Glases wurde elektrophoretisch mit Vollextrakt verglichen, um die Proteine den einzelnen Fraktionen der Kalbsherzmuskulatur zuzuordnen zu können (50 V, 3 mA, Puffer Tris-EDTA 2:1 verdünnt, Laufzeit 75 min.). Auf die Folien (Membranfolien zur Elektrophorese Firma Karl Schleicher und Schüll) wurde mit einer Mikropipette jeweils 0,005 ml des Kalbsherzvollextrakts und die gleiche Menge aus jedem einzelnen Auffanggläschen auf der gleichen

Grundlinie aufgetragen. Nach Durchführung der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Folien zur Proteinfärbung in Amidoschwarzlösung gelegt, die aus 0,5 % Amidoschwarz in Methanol-Eisessig (Verhältnis Methanol:Eisessig = 9:1) besteht. In Methanol-Eisessig der gleichen Zusammensetzung wurden die Folien entfärbt, auf Glasplatten aufgezogen, 7 Minuten in einer Lösung aus Butanol-Dioxan (3:1) fixiert und 5 Minuten bei 105° C im Trockenschrank getrocknet.

Bei der Auftrennung des Vollextraktes ergaben sich 8 Fraktionen, die - beginnend mit der am schnellsten zur Anode wandernden Fraktion - mit "1" bis "8" bezeichnet wurden. Bei zwei unabhängigen Auftrennungen verschiedener Kalbsherzvollextrakte durch die Elphor VAP ergab sich eine weitgehende Übereinstimmung der Verteilung der Fraktionen und des eiweißlosen Puffers (Glas 1-16+42-48) in den Auffanggläschen.

Für weitere Versuche wurden nur diejenigen Gläschen ausgewählt, deren Inhalt sich einer einzigen Fraktion zuordnen ließ, während Gemische ausgeschlossen wurden.

Die folgenden Versuche wurden mit Kalbsmyocardvoll-extrakt und den gereinigten Fraktionen in gleicher Weise durchgeführt.

3. Anreicherung des Herzmuskelextraktes und der isolierten Fraktionen mit Bilirubin

Um Bilirubin (Bilirubinum purissimum, Entwicklungslabor Serva, Heidelberg) im Versuchsmaterial anzureichern, wurden zwei Lösungsmittel verwendet: Äthanol und DMSO.

Gesättigtes Bilirubin-Äthanol-Gemisch wurde in Dosen von 0,05 bis maximal 0,3 ml je nach Menge des Versuchsmaterial, im Mittel etwa 0,05 ml Gemisch auf 2,5 ml Extrakt oder Serum, zugegeben; auf diese Weise wurde eine Ausfällung der Proteine weitgehend verhindert.

4. Vorbereitung des Versuchsmaterials zur präparativen Elektrophorese

Jedes Material wurde nach Anreicherung 24 Stunden dialysiert. Anreicherung und Dialyse wurden beendet, wenn Bilirubin ausfiel. Die Dialyse wurde im Kühlschrank bei 4° C mit Dialysierschläuchen der Firma Kalle gegen Tris-EDTA-Puffer durchgeführt und durch große Oberfläche des Versuchsmaterials gefördert; die Aufhängung der Dialysiersäcke an einem Arm, der von einem Motor gedreht wurde, sollte den Vorgang unterstützen.

Anschließend wurde das Material in der Kühlzentrifuge 10 Minuten bei 3000 Upm und einer Temperatur von 0° C zentrifugiert, wobei stets eine variierende Menge von Bilirubin ausfiel.

5. Durchführung der präparativen Elektrophorese

Dieses Material wurde für die Versuche mit der präparativen Elektrophorese benutzt. Zwei verschiedene Apparate standen zur Verfügung: Elphor VA mit Kühlung (Firma Dr. Bender & Hobein, München) und Elphor VA ohne Kühlung (Firma Dr. Bender & Hobein, München), die sich in ihrer Arbeitsweise jedoch nicht wesentlich unterscheiden. Um einige der Faktoren, die die

elektrophoretische Trennung beeinflussen, konstant zu halten, wurde die gleiche Apparatur benutzt und jeder Versuch in gleicher Weise durchgeführt. Als Trennbögen dienten Papiere der Firma Schleicher und Schüll, Nr. 604L, 2040a, 2043b, deren Trennschärfe und Auftrennzeit mit ansteigender Papiernummer zunimmt. Die Maße der Papiere sind gleich. Die Bögen wurden faltenlos glatt zwischen den Elektroden ausgespannt und gleichmäßig mit Puffer besprüht. Alle Versuche wurden mit Tris-EDTA-Puffer in Verdünnung 1:2 und 1:2,5 durchgeführt; der pH-Wert dieses Puffers liegt bei 8,9. Die Spannung betrug konstant 500 V; dabei ergab sich je nach Papiersorte und Puffer eine Stromstärke von 16 bis 20 mA. Nach 4-stündiger Vorlaufzeit wurden von dem Material, das sich in einer 1ml-Glasspritze mit eingeschliffenem Glaskolben befand kontinuierlich 0,04 ml pro Stunde punktförmig aufgetragen. Die Laufzeit eines Versuches variierte entsprechend der Menge des Materials. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Papier zunächst getrocknet und der Streifen des gewanderten Bilirubins, soweit sichtbar, gekennzeichnet. Das anschließende Färbebad zur Proteinfärbung aus Amidoschwarzlösung, die aus 0,5 % Amidoschwarz in Methanol-Eisessig (Verhältnis 9:1) besteht, dauerte 25 Minuten. Es folgte die Entfärbung in Methanol-Eisessig (ebenfalls 9:1), bis nach mehrmaligen Wechsel des Entfärbers dieser klar blieb. Abschließend wurde der Trennbogen noch getrocknet.

6. Immunoelektrophoretische Untersuchungen

Zur Prüfung der Identität des gesuchten Proteins mit einem bekannten Serumprotein wurde eine Immuno-Elektrophorese mit Antirinderserum durchgeführt. Als Material

diente sowohl Gesamtkalbsmyocardextrakt als auch die einzelnen Fraktionen. Die Antigene wurden unter Gleichspannung (40 V, 45 mA) 50 Minuten aufgetrennt; danach wurde das Immuns serum in den vorgesehenen Kanal eingelassen, die sich anschließende Diffusionszeit betrug 16 bis 18 Stunden. Als Puffer wurde Veronal-Acetat-Puffer mit einem pH von 8,2 verwendet.

7. Sephadex-Gel-Filtration

Um eine ungefähre Abschätzung des Molekulargewichtes vornehmen zu können, wurden die Fraktionen 2 und 3 der Gelfiltration unterworfen. Es wurde ein Dextran-gel vom Typ Sephadex G-200 verwendet (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden). Eine entsprechende Menge Sephadex G-200 wurde zum Quellen 3 Tage in destilliertes Wasser gegeben. Das gequollene Gel wurde nach Entlüftung mit einer Wasserstrahlpumpe in eine Säule von Durchmesser 1,3 cm eingefüllt. Die Höhe des Gelbettes betrug nach Sedimentierung 25 cm. Ein Ultraviolett-Absorptionsgerät Uvicord (Absorption bei 2537 Å) wurde direkt mit dem Säulenausfluß verbunden und die UV-Absorption mit Hilfe eines Punktschreibers registriert. Anschließend wurden die Komponenten des Eluates mit einem automatischen Fraktionssammler Radi-Rac aufgefangen: Glaswechsel alle 3,3 Minuten. (Alle Geräte von Fa. LKB Produkter AB Stockholm, Schweden.) Der Fraktionssammler wurde in dem Moment in Betrieb gesetzt, als das UV-Absorptionsgerät das Erscheinen von Eiweiß im Eluat anzeigte. Vor ihrer Beschickung wurde die Säule mit dem Elutionsmittel - Tris-EDTA-Puffer - äquilibriert, indem dieses 12 Stunden durch die Säule gepumpt wurde. Dazu wurde eine peristaltische Pumpe verwendet (Fa. Hans Heidolph, Schwabach),

die eine ruckfreie Förderung des Elutionsmittels gestattete; die Durchflußgeschwindigkeit wurde auf 17 ml pro Stunde eingestellt. Das aufgetragene Probevolumen von Fraktion 2 und 3 betrug 0,6 ml.

8. Lipoproteinfärbung

Zur Durchführung der Lipoproteinfärbung wurden die mit Fraktion 3 beschickten Membranfolien in einem geschlossenen Gefäß ozonisiert, in dem konzentrierte H_2SO_4 auf Bariumperoxid einwirkte. Nach 15 Minuten wurden die Streifen in 0,001n HCl gespült und weitere 15 Minuten mit Schiff's Reagenz gefärbt. Anschließend wurden die Folien für die Dauer von 10 Minuten in eine Mischung aus 1 Teil Äthylalkohol und 1 Teil 0,1n HNO_3 gelegt und abschließend getrocknet.

III. ERGEBNISSE

1. Vergleich der Lösungsmittel DMSO und Äthanol

Versuche, bei denen Serum mit Bilirubin angereichert worden war, wurden zur Testung des Lösungsmittels benutzt, da die Bindung von Bilirubin im Serum bekannt ist. Weiterhin konnten diese Vorversuche zeigen, ob die Ergebnisse der präparativen Elektrophorese eindeutig zu interpretieren wären.

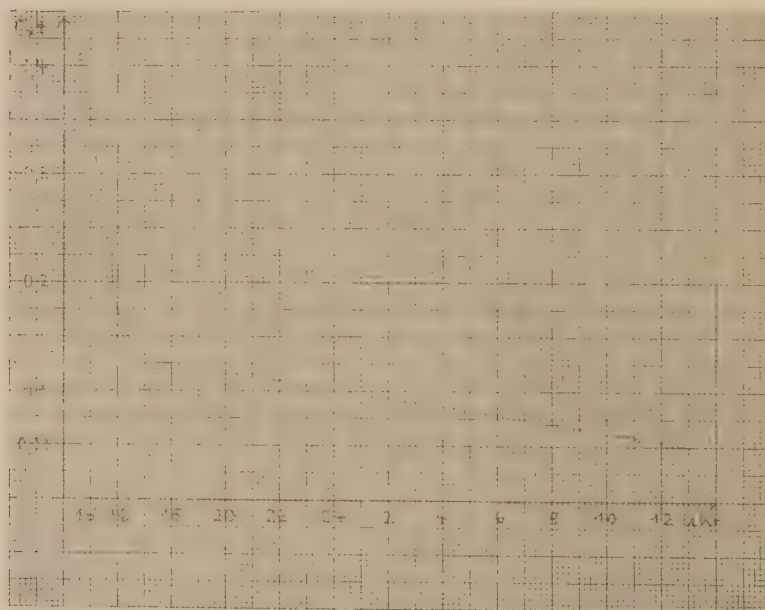
Eine exakte Dosierung, die eine rechnerische Bestimmung der Bilirubinkonzentration im Material ermöglicht hätte, war mit beiden Lösungsmitteln - DMSO und absoluter Äthanol - nicht gegeben. Da das Material maximal mit Bilirubin angereichert werden mußte, war es nicht möglich, eine Ausfällung von nicht gelöstem Bilirubin bei der Zentrifugierung zu verhindern. Zur Kenntnis der Bilirubinkonzentration in dem angereicherten Material diente die quantitative Nachweisreaktion von van Bergh (modifiziert nach Jessandrik und Grot). Je nach Lösungsmittel schwankte die Bilirubinkonzentration in Serum und Kalbsherzextrakt.

Bei Mischserum, das mit DMSO gelöstem Bilirubin angereichert worden war, lag die Konzentration um 4,2 mg%; 0,5 mg% betrug die Konzentration bei Herzextrakt, der auf die gleiche Weise angereichert war. Bei Verwendung von Äthanol als Lösungsmittel stieg die Bilirubinkonzentration im Herzextrakt auf 0,7 mg%, während sie bei Mischserum, nach gleicher Vorbehandlung, auf 1,3 mg% fiel. Für Mischserum erwies sich so eine Anreicherung mit DMSO als günstiger, für Myocardextrakt schien Äthanol das bessere Lösungsmittel zu

sein. Weitere Versuche sprachen dafür, nur noch Äthanol zu verwenden:

- a) Jeweils vor und nach einer Ultrazentrifugierung wurde die Bilirubin-Konzentration in einem Material bestimmt, das aus 4,75 ml Kalbsherzextrakt und 0,25 ml Bilirubin-DMSO-Lösung bestand. Vor der Ultrazentrifugierung wurde eine Konzentration von 6,13 mg% ermittelt, die danach auf 0,41 mg% abgesunken war.
- b) Ein weiterer Versuch zeigte die starke Abnahme der Bilirubin-Konzentration im Vollextrakt im Laufe mehrerer Stunden. 1 ml einer Lösung, die aus 5 mg Bilirubin in 2,5 ml DMSO zusammengesetzt war, wurde zu 9 ml Kalbsherzextrakt gegeben und bei 0° C in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Unmittelbar danach ergab sich eine Bilirubin-Konzentration von 6,4 mg%, die nach 3 Stunden auf 1,55 mg% und nach 21 Stunden auf 0,52 mg% abfiel.
- c) 0,25 ml Bilirubinlösung, aus 5 mg Bilirubin und 2,5 ml DMSO hergestellt, wurde 2,25 ml Kalbsherzextrakt zugesetzt. Die Extinktionen dieses angereicherten Extraktes wurden bei den Wellenlängen von 400 - 550 m μ im Spektralphotometer gemessen. Das Maximum der Extinktion lag bei 450 m μ , doch zeigte sich innerhalb von Stunden eine rapide Abnahme der Meßwerte.
- d) Bilirubin, das in DMSO gelöst ist, wandert in der präparativen Elektrophorese anodenwärts, wie ein Versuch mit Bilirubin-DMSO-Gemisch zeigte. Makroskopisch war ein orangefarbener Schweif zu sehen,

auch ergab eine Bilirubinbestimmung im Inhalt einiger Auffanggläschen Werte um 1,4 mg%. Dagegen wanderte Bilirubin, das in Äthanol gelöst war, nicht, sondern blieb an der Auftragsstelle liegen. Diese Beobachtung war von großer Bedeutung, da damit ein Indikator zur Verfügung stand. Wenn makroskopisch eine Wanderung des Bilirubin festzustellen war, das in einer Äthanollösung dem Versuchsmaterial beige-fügt worden war - und wenn in den Auffangröhrchen Bilirubin nachzuweisen war, so konnten diese beiden Tatsachen als Beweis dafür gelten, daß Bilirubin an ein Vehikel gebunden war, das aber keinesfalls das Lösungsmittel Äthanol sein konnte, sondern eine Komponente des Materials sein mußte.



Extinktionswerte von Kalbsherzextrakt, mit Bilirubin-DMSO-Gemisch angereichert - gemessen bei 450 m μ (während 20 Stunden)

Die Pherogramme des Versuchsmaterials: Äthanol-gelöstes Bilirubin in Humanmischserum zeigten eine Wanderung des orangefarbenen Bilirubin vom Auftragungsort anodwärts. Dieser Streifen erwies sich nach der Proteinfärbung mit der Fraktion des Serumalbumins identisch. Ebenso konnte in den Auffanggläschen des Albumins eine Bilirubin-Konzentration von 0,2 mg% nachgewiesen werden bei einer Konzentration des Versuchsmaterials von 1,3 mg%.

2. Auftrennung des mit Bilirubin angereicherten Kalbsmyocards

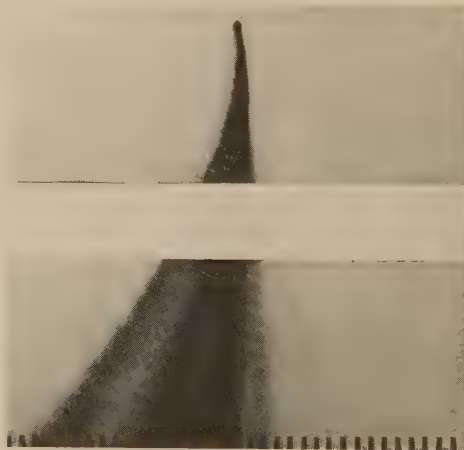
Bei Auftrennung des Myocardextrakts kamen 8 Proteinfractionen zur Darstellung. Die Qualität des Pherogramms war von der Spannung abhängig und stieg bei Werten über 500 V. Auch die Pufferverdünnung beeinflusste die Qualität, im allgemeinen brachte Tris-EDTA 1:2,5 verdünnt, bessere Ergebnisse.



Elektrophoretische Auftrennung des Gesamtmyocardextraktes mit Kennzeichnung des Bilirubinstreifens. 8 Proteinfractionen kommen zur Darstellung. 50 V, 18mA, Laufzeit 26 Std., Tris-EDTA 1:2,5

Die 8 Fraktionen wurden mit fortlaufenden Nummern belegt, wobei die am weitesten anodenwärts wandernde Fraktion als Fraktion 1 bezeichnet wurde. Diese Fraktion, die stark anfärbbar ist, stellt ein Hauptprotein des Myocards dar; da ihre immunologische Identität mit Serumalbumin nachgewiesen ist (2,35, 36), wurde für sie der Name "Myoalbumin" vorgeschlagen.

Fraktion 2 ist schwierig darzustellen, da nur sehr geringe Mengen im Myocard vorliegen. Sie ist deutlich von der benachbarten Fraktion 1 getrennt, jedoch von Fraktion 3, die ebenfalls nur in geringer Konzentration vorhanden ist, schwer trennbar.



Nach Beendigung der Elektrophorese und des Trockenprozesses, jedoch vor der Färbung wurde ein Streifen aus dem Papierbogen geschnitten und später wieder eingefügt. Im ungefärbten Mittelbezirk ist ein schwacher, orangefarbener Bilirubinstreifen anodenwärts der Myoglobinsbande (Fraktion 6) zu sehen. Dieser Streifen ist seinem Verlauf nach der Fraktion 3 zuzuordnen. 50 V, 16mA, Laufzeit 30 Std., Tris-EDTA 1:2.

Es folgen die Fraktionen 4, 5, 6, deren elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeiten nicht stark differieren. Hier, besonders in 5 und 6 finden sich die Farbstoffe, die dem Muskel seine charakteristische Farbe verleihen. Diese Fraktionen sind in höherer Konzentration im Herzextrakt vertreten. Die weiter zur Kathode gelegenen Fraktionen 7 und 8 stellen dagegen mengenmäßig geringere Anteile des Myocards dar.

Bei Versuchen mit Gesamtmyocardextrakt, der mit Äthanol-gelöstem Bilirubin angereichert war, war stets ein orangefarbener Schweif zu beobachten - der Indikator des Bilirubin-Protein-Komplexes. Die Länge dieses Streifens war von der Versuchsdauer abhängig, erreichte aber nur einmal nach 51-stündiger Laufzeit die untere Seite des senkrecht hängenden Trennbogens. Unabhängig von der Ausdehnung des Streifens konnte in 2-3 Auffanggläschen stets Bilirubin nachgewiesen werden, wenn die Konzentration auch nie die Ausmaße der Versuche mit Mischserum erreichte.

Nach der Färbung konnte der gekennzeichnete Streifen der Fraktion 3 zugeordnet werden.

3. Elektrophoretische Untersuchungen mit den getrennten Fraktionen

Obwohl die Versuche mit Gesamtkalbmyocardextrakt keine Bindung des Bilirubin an die am schnellsten wandernde Fraktion zeigten, wurde dieses Ergebnis mit der rein dargestellten Myoalbuminfraktion nachgeprüft. 8 ml der eingeeengten reinen Myoalbuminfraktion wurden im Laufe von 2 Tagen insgesamt 0,7 ml

Bilirubin-Äthanollösung zugefügt, 3 Tage wurde im Kühlschrank dialysiert. Nach der Zentrifugierung wurde der Bilirubingehalt bestimmt: er betrug 0,2 mg%. Ein Teil dieses Materials wurde für einen Versuch in der präparativen Elektrophorese verwendet; infolge der geringen Bilirubinkonzentration zeigte sich nur ein schwach gefärbter Fleck an der Auftragungsstelle. Beim Färben des Pherogramms erwies sich die Eiweißkonzentration als sehr gering. Daher wurde der restliche Teil des Materials, das zu diesem Versuch verwendet worden war, im Kühlschrank mit Polyäthylenglykol eingeengt, bis eine Eiweißkonzentration von 12 g% erreicht war. Es wurde nochmals der Bilirubingehalt bestimmt, der nun 2 mg% betrug. Ein Versuch mit diesem Material verlief ebenfalls negativ; es zeigte sich keine Ausziehung des orangefarbenen Bilirubinkleckses in Richtung der anodisch gewanderten Myoalbuminfraktion. In den Auffangröhrchen bei diesen und weiteren Versuchen mit Fraktion 1 konnte ebenfalls nie Bilirubin nachgewiesen werden. Die verschiedenen Bilirubinkonzentrationen in dem oben beschriebenen Versuchsmaterial sind durch die starke Verdünnung der Eiweißfraktion zu erklären.

Eine Bindung des Bilirubin an Myoalbumin konnte mit der angewandten Methode der präparativen Elektrophorese nicht nachgewiesen werden.

Versuche mit den weiteren Fraktionen 8, 7, 6, 5, 4, 2, verliefen ebenfalls negativ. Bilirubin blieb stets an der Auftragsstelle liegen; auch in den

Auffanggläschen konnte trotz Konzentrierung des Inhalts kein Bilirubin nachgewiesen werden.

Eine Wanderung des Bilirubin - ein orangefarbener Streifen, der bis zur Mitte des Bogens reichte, zeigte sich nur beim Versuch mit Fraktion 3. Der Bilirubingehalt in den Auffangröhrchen betrug 0,05 mg%.

4. Ergebnis der Lipoproteinfärbung

Da in der Literatur (17, 45) eine Bindung von Bilirubin an Lipoprotein in der Zelle angegeben wird, wurde eine Lipoproteinfärbung der Fraktion 3 durchgeführt. Im Gesamtextrakt erwies sich die Konzentration dieser Fraktion als nicht ausreichend, doch konnte nach Einengung der reinen Fraktion 3 mit Polyäthylenglykol eine schwache Anfärbung erzielt werden.

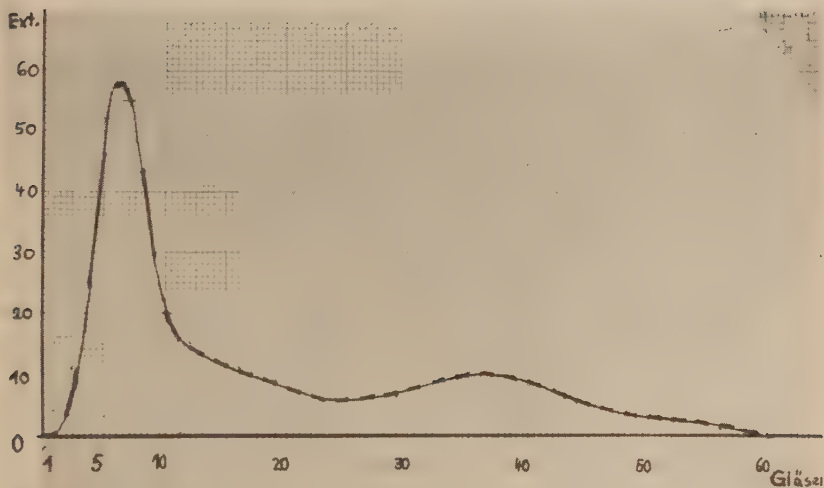
5. Immunoelektrophoretische Untersuchungen

Die Fraktionen 2 und 3 wurden immunoelektrophoretisch untersucht. Hierbei erwiesen sich beide Fraktionen als nicht absolut rein. Wie sich mit Hilfe auch dieser Methode zeigte, ist die Fraktion 3, an die sich Bilirubin bei den Versuchen mit der präparativen Elektrophorese gebunden hatte, wahrscheinlich den α - Globulinen zuzuordnen.

6. Abschätzung des Molekulargewichtes mittels Sephadex-Gel-Filtration

Die Fraktionen 2 und 3, die mit Äthanol-gelöstem Bilirubin, wie beschrieben, angereichert worden waren,

wurden weiterhin der Gel-Filtration unterworfen. Diese Methode, die eine Abschätzung des Molekulargewichtes erlaubt, kann auch zur Trennung von proteingebundenem Bilirubin und ungebundenem Bilirubin benutzt werden (39). Die Prüfung der einzelnen Gläser des Fraktionssammlers auf Bilirubin ergab folgendes: Mit dem ersten Auftauchen von Eiweiß am Säulenende erscheint zugleich Bilirubin - ein Beweis für die Bindung von Bilirubin an dieses Protein. Außerdem befindet sich Bilirubin fast ausschließlich in den Gläsern 1 bis 8. Die Konzentration an Bilirubin ist hier so hoch, daß dieses makroskopisch festgestellt werden kann. Das Bilirubin ist also nicht gleichmäßig auf den ersten Absorptionsgipfel verteilt. Ein Vergleich mit einer Humanserumauftrennung auf der gleichen Säule unter gleichen Bedingungen zeigte, daß die hochmolekularen Serumproteine nach der gleichen Zeit die Säule durchlaufen hatten wie die bilirubinhaltige Fraktion aus dem Kalbsmyocard. Berücksichtigt man, daß Sephadex G-200 für Peptide und globuläre Proteine einen ungefähren Trennungsbereich von Molekulargewicht 4 - 600 000 aufweist (13), so läßt sich daraus schließen, daß es sich bei dem Protein, an das Bilirubin gebunden ist, um ein hochmolekulares Globulin handelt, dessen Molekulargewicht oberhalb der Ausschlußgrenze des verwendeten Gels liegt.



Dextran-Gel-Filtration der Fraktionen 2 und 3.
Jede dünnere und jede dickere Linie entspricht
jeweils einem Auffangglas, der Wechsel erfolgte
alle 3,33 Minuten. Bilirubin konnte in den Glä-
sern 1 bis 8 nachgewiesen werden.

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Bei Bestimmung des Serumbilirubinspiegels von Patienten mit hämolytischem Icterus beobachteten Hijmans van den Bergh und Müller 1916 (4), daß neben der bekannten direkten Reaktion mit der diazotierten Sulfanilsäure eine weitere "indirekte" Reaktion nach Zufügen von Alkohol auftrat. Damit war der erste Hinweis gegeben, daß zwei verschiedene Arten von Bilirubin im Serum vorliegen. In der Folgezeit wurden die Möglichkeiten, die dieser unterschiedlichen Reaktion zugrunde liegen, wie etwa eine Bindung an verschiedene Eiweißkomponenten, erörtert. Doch wurden erst nach 40 Jahren die biochemischen Gründe für die indirekte und direkte Diazo-Reaktion aufgedeckt. 1956 wurde von verschiedenen Forscherteams (5, 40, 37, 38) gezeigt, daß das direkt reagierende Bilirubin einen Ester der Glucuronsäure und des Bilirubin darstellt. Weiterhin wurde festgestellt, daß dieses wasserlösliche Bilirubin aus zwei Komponenten besteht. Talafant (38) und Billing (6) identifizierten die größere Komponente, die das Hauptpigment des Gallensaftes darstellt, als Diglucuronid; Billing und Lathe (5) die zweite als Monoglucuronid. Nach neuesten Ergebnissen (29) soll jedoch ein bimolekularer Komplex, der sich im Serum und extrahepatischen Geweben aus freiem Bilirubin und Bilirubindiglucuronid bildet, als dieses Monoglucuronid aufgefaßt worden sein. Einen weiteren wasserlöslichen Bilirubinester fanden Isselbacher und McCarthy im Bilirubin-Sulfat (21). Klatskin und Bungards (22) erkannten, daß die Proteinbindung des indirekten und des direkten Bilirubins im pH-Bereich von 5 bis 9 besteht und daß

unter pH 5 die Bindung des direkt reagierenden Bilirubins teilweise, die des unveresterten indirekten vollständig aufgehoben ist. Aus dieser Tatsache schloß Billing (8), die Bindungsart sei bei beiden Typen verschieden.

Über die Proteinbindung von Bilirubin im Serum wurde schon seit längerer Zeit gearbeitet: 1930 postulierte Bennhold (3), der als einer der ersten über die Vehikelfunktionen der Serumeiweißkörper arbeitete, daß Bilirubin im Serum an Albumin gebunden sei; nach seiner Ansicht steigert der Körper den Albumingehalt des Plasmas bei hohem Bilirubinspiegel. Diese Ansicht wurde von mehreren Forschern unterstützt (31; weitere Literatur bei 43). Martin (27) bestätigte diese Beobachtungen, fand jedoch bei der Elektrophorese eine zweite Komponente im Bereich der α -Globuline, an die sich Bilirubin gebunden hatte (ebenso 28 und 19). Westphal, Ott und Gedigk (46) beschrieben neben der bekannten Albuminbindung eine weitere Proteinbindung des Bilirubins: im Serum eines Gesunden war es an α_2 -Globuline gebunden, während in ikterischem Serum sich eine Verknüpfung mit β -Globulinen zeigt. Bilirubin-Komplexe sämtlicher Serumfraktionen: Albumin, α_1 , α_2 , β - und γ -Globuline beobachteten Klatskin und Bungards (23). Die früheren Angaben (26) wurden von Watson (43) bestätigt, der die Bindung an α_1 -Globuline jedoch nur bei starker Hyperbilirubinämie ausgeprägt fand. Nach Odell (32) kann das beschriebene α_1 -Globulin aufgrund seiner größeren Affinität mehr unkonjugiertes Bilirubin binden als Albumin; doch enthält das Serum so wenig dieser α_1 -Fraktion (0,05 g% der Plasmaproteine), daß der Anteil von Bilirubin, der daran gebunden ist,

verglichen zum Gesamtbilirubinspiegel, nicht ins Gewicht fällt. In einer neuen Arbeit über die Bindungskapazität des Serums für Bilirubin (34) werden vornehmlich zwei Beobachtungen vorgetragen: 1. Reines Albumin bindet stets weniger Bilirubin als Serum, 2. ein Gemisch von Albumin und α -Globulin hat ebenfalls eine größere Bindungskapazität als reines Albumin. Der Autor schließt daher auf eine Wechselwirkung zwischen Albumin und α -Globulin, die die Bindungskapazität für Bilirubin beeinflusst. Nach heutiger Auffassung wird die Transportfunktion des Bilirubin im Serum den Albuminen, den α_1 und α_2 -Globulinen zugeschrieben (1, 8), während den gereinigten β - und γ -Globulinen keine signifikante Affinität zu Bilirubin nachgewiesen werden konnte.

Die toxischen Wirkungen des Bilirubin auf den Zellstoffwechsel wurden durch Experimente in vitro und in vivo nachgewiesen. Eine Beimengung von Bilirubin zu Hirnbrei in Konzentrationen, wie sie im Serum Rh-geschädigter Kinder gefunden werden, führt nach Beobachtung von Lathe (24) zu einer Abnahme des O_2 -Verbrauchs. Day (12) bestätigte dies, nach seinen Versuchen kann die gehemmte Zellatmung durch Zugabe von Cytochrom C reaktiviert werden. Der gleiche Effekt wurde mit Hilfe von Diphosphorpyridin-Nukleotiden von Bowen und Waters (9) erzielt. Die gleichen Autoren beschrieben als weitere toxische Wirkung des Bilirubins die Hemmung des Elektronentransports (10). Zetterström und Ernster (47) fanden bei Versuchen an isolierten Mitochondrien aus Rattenleber eine Hemmung der oxydativen Phosphorylierung, wenn die zugefügte Bilirubinmenge mehr als 20 mg% betrug;

isolierte Mitochondrien aus Hirngewebe wurden in gleicher Weise beeinflußt (16). Bei erwachsenen lebenden Ratten, denen intrazisternal p-Chlormercuribenzoat injiziert worden war, das die Blut-Liquor-Schranke herabsetzt, zeigte sich nach weiterer Injektion von Bilirubin ebenfalls eine Hemmung der oxydativen Phosphorylierung in den Hirnzellen (16). Die Entkopplung dieser biochemischen Reaktion in den Mitochondrien des gesamten Hirns wurde auch von Diamond und Schmid beobachtet, die ebenfalls bei Ratten eine Bilirubinzephalopathie erzeugt hatten (15). Nach ihren Angaben liegt die Bilrubinkonzentration, die in vitro eine Schädigung auslöst, weitaus höher, als die Menge, die im Hirn geschädigter Versuchstiere gefunden wird, obwohl nur ein geringer Teil der Bilirubingesamtmenge an Mitochondrien gebunden ist. Die neuralen Läsionen werden jedoch nicht allein durch die Hemmung der oxydativen Phosphorylierung verursacht (14). Die direkte toxische Einwirkung von Bilirubin auf die Nerveⁿzelle bestreitet Charbonnier, der bei Inkubation von Gewebsschnitten mit Bilirubin in der histochemischen Untersuchung statt einer Enzymhemmung eine allgemeine Aktivitätssteigerung der wichtigsten Enzymsysteme feststellte (11). Die genannten toxischen Wirkungen sind stets nur dem unkonjugierten Bilirubin zuzuschreiben (1).

Bilirubin wird im vasalen, interzellulären und intrazellulären Raum gefunden. Allgemein wird angenommen, daß es interzellulär ebenso wie im Plasma an Albumin gebunden ist; das unkonjugierte, an kein Protein gebundene Bilirubin liegt im Plasma nur in

äußerst geringen Mengen vor (32). Der Durchtritt durch die Zellmembran ist nur dem Bilirubinmolekül möglich, das von der Proteinbindung gelöst ist; der Durchtritt durch eine semipermeable Membran war schon früh beobachtet worden (18). Der Eintritt des proteinfreien Bilirubin in die intrazelluläre Flüssigkeit ist nach Odell (31) weniger von der totalen Bilirubinkonzentration im Blut abhängig als von dem Konzentrationsgradienten des dissoziierten Bilirubin gegen die Zellmembran. Dieser Konzentrationsgradient kann unabhängig von der Bilirubinsgesamtmenge anwachsen, wenn die Bindungskapazität der Plasmaproteine für Bilirubin vermindert wird. Dies ist bei Hypoalbuminämie der Neugeborenen der Fall und läßt sich auch experimentell zeigen. Da organische Anionen, wie Salicylate die Bilirubin-Protein-Bindung sprengen, um mit Albumin einen Komplex zu bilden, wächst die Konzentration des dissoziierten Bilirubin an; auf diese Weise gelangt mehr Bilirubin durch die Zellmembran in den intrazellulären Raum (32).

Die Affinität der einzelnen Gewebe zu Bilirubin ist sehr verschieden, an der Spitze steht das Nervengewebe, wo Bilirubin bevorzugt in den Basalganglien, dem Hippocampus und den Vorderhornzellen des Rückenmarks abgelagert wird (1). Der Kernicterus, der durch Bilirubinablagerung, zum Teil in intrazellulären Kristallen, in den genannten Gebieten gekennzeichnet ist und nur unmittelbar post partum auftritt, zu einem Zeitpunkt also, da die Liquor-Hirn-Schranke noch nicht völlig ausgebildet ist, wird durch extrem hohe Bilirubinspiegel, besonders des indirekten, nicht glucuroniierten Bilirubin hervorgerufen. Es sind jedoch

Fälle beschrieben, die bereits bei einer Konzentration von nur 9 mg% Bilirubin im Blut Kristalleinlagerungen in einzelnen Hirnzellen aufwiesen (41). Neben dieser bevorzugten Ablagerung von Bilirubin im Hirngewebe finden sich in Extremfällen (Bilirubinspiegel über 25 mg%) intrazelluläre Kristalle in Blutzellen, Knochenmark und Liquor, besonders in Lymphozyten und Monozyten. Das Muskelgewebe zeigt wenig Affinität zu Bilirubin, denn bei Versuchstieren, die im Serum eine Gesamt-Bilirubin-Konzentration von 36,5 mg% zeigten, wurde im Muskelgewebe nur eine solche von 1,2 mg% gefunden (44). Die Färbung des Elastins durch Bilirubin, die seit langem augenfällig bekannt ist, soll - zumindest zum Teil - durch Gallenfarbstoff im interzellulären Raum hervorgerufen sein, der hier noch an Plasmaalbumin gebunden ist (7).

Die Ansicht, in den Zellen sei Bilirubin abgelagert, wird von mehreren Autoren bestritten. Vogel extrahierte mit Chloroform das Pigment aus kernicterischen Hirnen und fand eine Absorption bei $\lambda = 425 \text{ m}\mu$, die einem in Chloroform gelösten Mesobilirubin entspricht. Er schloß daher, Bilirubin werde innerhalb des Gehirns zu Mesobilirubin reduziert, das auch für die Pigmentation verantwortlich sei (43). Aus der Tatsache, daß der histochemische Nachweis von Bilirubin im ZNS bisher nicht gelang, folgert von Leibnitz, Bilirubin liege entweder in verschiedenen Bindungsformen vor oder mehrere Gallenfarbstoffe wären in diesen Arealen abgelagert (25).

Die Frage der intrazellulären Ablagerung von Bilirubin, bzw. der intrazellulären Eiweißbindung ist

wenig untersucht. Nach Odell ist Bilirubin inter- und intrazellulär an Proteine des Gewebes, jedoch nicht an Albumin gebunden (32). Watson betont die Bedeutung des - Lipoprotein-Bilirubin-Komplexes im Serum, der auf die lipophilen Eigenschaften des Gallenfarbstoffes begründet ist; denn dieser Komplex könnte die Transportform des Bilirubin vom Plasma in den zellulären Raum darstellen. Auch die Bindung des Bilirubin in der Zelle stellt nach Watson eine Bilirubin-Lipoprotein-Verknüpfung dar (45). Die Theorie der zellulären Bilirubin-Lipoprotein-Bindung unterstützt Ernster. Die Ablagerung des Bilirubin in den Hirnzellen erfolgt durch die Übertragung von Albumin auf Lipoprotein; demnach wäre die enorme Affinität des Hirngewebes für Bilirubin durch seinen Reichtum an Lipoproteinen zu erklären (17).

Da der Bilirubin-Serumalbumin-Komplex zweifelsfrei nachgewiesen ist, wäre eine Bindung von Bilirubin mit Albumin auch in der Zelle zu erwarten, falls diese Eiweißfraktion stets analoge Funktionen hätte. Um die Identität von Muskel- und Serumproteinen festzustellen, trennten mehrere Autoren Muskelextrakte elektrophoretisch auf und suchten mit Hilfe der Immunoелеktrophorese die einzelnen Fraktionen den Serumprotein-komponenten zuzuordnen. Bereits 1947, also bereits vor Ausarbeitung der immunoелеktrophoretischen Technik, stellte Jacob elf unterscheidbare Fraktionen in der Skelettmuskulatur des Kaninchens fest (22). Scheiffarth (35) untersuchte Leber, Niere, Herzmuskel und Skelettmuskulatur des Menschen mit dem Diffusionsverfahren von Ouchterlony und mit Agargелеlektrophorese. Als Ergebnis der Agargeldiffusion

des Herzmuskelextraktes beschrieb er 3 Präzipitationslinien, von denen sich eine mit der Mobilität der schnell wandernden α_1 -Serumglobuline oder des Serumalbumins bewegte, eine weitere, die mit den α_2 -Globulinen vergleichbar war und eine dritte, die sich kaum vom Auftragsstrich anodenwärts bewegte. Die Immunoelktrophorese des Herzmuskels brachte bis zu 6 Komponenten mit Unterfraktionen. Neben Albumin waren $2\alpha_1$ -, $4\alpha_2$ -, $2-3\beta_1$, 1β und 1γ -Fraktion nachzuweisen; die α_2 -Fraktion war mit dem Serum- α_2 -Lipoprotein zu vergleichen, während das Makroglobulin der α_2 - und β_2 -Gruppe fehlte. Weitere Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe (36) glichen dem oben beschriebenen Eiweißmuster des Herzmuskels weitgehend: Die Präzipitationslinien in der Immunoelktrophorese zeigten sich bei Albumin, $2\alpha_1$ -Komponenten und je nach Versuchsbedingungen bei 2-3 Fraktionen im α_2 -Bereich. Im Zwischenbereich von α_2 - und β_1 -Globulin fand sich eine weitere Präzipitationslinie, ebenso im γ -Globulinbereich. Spätere Untersuchungen der gleichen Autoren (20) stellten die Identität der fermenttragenden Serum- und Organproteine fest, doch konnten einige Fraktionen der Herzmuskulatur nicht den bekannten Serumfraktionen zugeordnet werden. Bauer (2) erhielt bei Auftrennung von Muskelproteinen in freier Elektrophorese 6 - 11 Fraktionen. Bei Anwendung der Immunoelktrophorese, bei der er 10 Präzipitationslinien fand, stellte er die Identität von Serum- und Muskelalbumin, α_1 -Lipoprotein, α_2 -Makroglobulin, Transferrin und γ -Globulin fest. Drei muskeleigene Proteine, die immunologisch kein Gegenstück im Serum besitzen, werden angegeben; die stärkste Präzipitationslinie findet sich kathodenwärts neben

dem Transferrin des Serums, 2 schwächere Komponenten zeigten sich am weitesten kathodenwärts gelegen. Nicht identifiziert wurde eine Fraktion im Grenzbereich zwischen α - und β -Globulin. Sechs Fraktionen eines Muskelextraktes sind demnach mit entsprechenden Serumkomponenten identisch. Ob sich aus dieser Analogie des immunologischen Aufbaus auch eine Analogie der Funktion ergibt - diese Frage wurde von Nowy (30) in Hinblick auf Stoffbindungen untersucht. Myoalbumin verfügt demnach nicht über die Fähigkeit, Stoffe wie Cardio green und Evans blue zu binden, die im Serum von Albumin transportiert werden. Diese Farbstoffe bilden mit einer anderen Komponente des Organproteins einen Komplex. Nach Leidl (26) ist Evans blue an eine Fraktion des Myocards gebunden, die mit der in der vorliegenden Arbeit Fraktion 3 genannten Eiweißkomponente identisch ist. Odell (32) betont ebenfalls, daß intrazellulär keinesfalls ein Bilirubin-Albumin-Komplex vorliegt. Auch Watson (45) bestreitet eine Bilirubin-Albumin-Bindung; aus theoretischen Überlegungen - die Transportform des Bilirubin vom Plasma in die Zelle stellt einen Komplex mit Lipoprotein dar - postuliert er das Bestehen einer Bilirubin-Lipoprotein-Bindung in der Zelle. Auch nach Ernster (17) besteht eine solche Bindung im Gewebe, die auf der großen Affinität der Lipoproteine zu Bilirubin begründet sei. Ein experimenteller Nachweis für diese Vorstellungen wurde unseres Wissens bisher jedoch noch nicht erbracht. Die vorliegenden Versuche können als Unterstützung dieser Überlegungen gewertet werden: a) Es wurde keine Bindung zwischen Myoalbumin und Bilirubin beobachtet. b) Bei der Lipoproteinfärbung konnte eine Anfärbung der Fraktion 3, deren Bindungsfähigkeit für Bilirubin durch die vorangegangenen Versuche festgestellt worden war, wahrscheinlich gemacht werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Als Versuchsmaterial für die vorliegenden Versuche wurde Kalbsmyocardextrakt und daraus gewonnene Eiweißfraktionen verwendet. Um eine Bindung von Bilirubin an die intrazellulären Proteine nachzuweisen, wurde der Gesamtextrakt und die aufgetrennten Fraktionen mit einem Bilirubin-Äthanol-Gemisch durch Dialyse angereichert. Dieses Material wurde der präparativen Elektrophorese unterworfen, wobei sich eine Wanderung des Bilirubins mit der sogenannten Fraktion 3 zeigte. Eine anschließende Lipoproteinfärbung machte die Zuordnung der sog. Fraktion 3 zu den Lipoproteinen wahrscheinlich. Immuno-elektrophoretische Untersuchungen wiesen durch Wanderung der Fraktion 3 mit den α -Globulinen auf eine Zugehörigkeit zu dieser Proteingruppe hin. Mittels Sephadex-Gel-Filtration wurde ein Molekulargewicht dieser Fraktion von mindestens 500 000 ermittelt.

LITERATURNACHWEIS

1. Arias J.M. "The chemical basis of kernicterus"
Advances in Clinical Chemistry Vol 3/1960
2. Bauer H., Glötzner F., Schwarze J., Schmalbach K.
"Elektrophoretische und immunoelektrophoretische
Studien über Muskelproteine" Klin. Wschr. 42:1198/
1964
3. Bennhold H. "Über die Anpassung der Serumeiweiß-
körper an die Transportnotwendigkeiten im kranken
Organismus" Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 32:353/1930
4. van den Bergh H., Müller P. "Über eine indirekte
Diazoreaktion auf Bilirubin" Biochem. Z. 77:90/1916
5. Billing B.H., Lathe G.H. "Excretion of bilirubin
as an ester glucuronide, giving the direct van den
Bergh reaction" Biochem. J. 6:6/1956
6. Billing B.H., Cole P.G., Lathe G.H. "The excretion
of bilirubin as a diglucuronide giving the direct
van den Bergh reaction" Biochem. J. 65:774/1957
7. Billing B.H., Lathe G.H. "Bilirubin metabolism
in jaundice" Am. J. Med. 24:111/1958
8. Billing B.H. "Bile pigments in jaundice" Advances
in Clinical Chemistry Vol 2/1959
9. Bowen W.R., Waters W.J. "Bilirubin encephalopathy:
Studies related to the site of inhibitory action
of bilirubin on brain metabolism" A.M.A.J. Diseases
Children 93:21/1956

10. Bowen W.R., Waters W.J. "The possible mechanism and site of bilirubin inhibition of electron transport" A.M.A.J. Diseases Children 96:507/1958
11. Charbonnier A. Vortrag über Bilirubintoxizität bei Int. Symposium "Der Icterus" Freiburg/Br.1967
12. Day R.L. "Inhibition of brain respiration in vitro by bilirubin reversal of inhibitions by various means" Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 85:261/1954
13. Determann H. "Gelchromatografie" Springer Verlag 1967
14. Diamond J. "Kernicterus: revised concepts of pathogenesis and management" Pediatrics 38:539/1966
15. Diamond J., Schmid R. "Oxidative phosphorylation in exp. bilirubin encephalopathy" Science 155:1288/1967
16. Ernster L., Zetterström R. "Exp. studies on the pathogenesis of kernicterus" Pediatrics 20:647/1958
17. Ernster L. "Action of bilirubin on mitochondria" Kernicterus ed. by A. Sass-Kortsak University of Toronto Press 1961
18. Forrai E., Sivo R. "Physikalisch-chemische Eigenschaften des Bilirubin in Körperflüssigkeiten" Biochem. Ztschr. 189:162/1927

19. Gray C.H., Kekwick R.A. "Bilirubin serum protein complexes and the van den Bergh reaction" *Nature* 161:274/1948
20. Götz H., Scheiffarth F. "Immunoelektrophoretische Untersuchungen an Organextrakten" *Klin. Wschr.* 41:587/1963
21. Isselbacher K.J., McCarthy E.A. "Studies on bilirubin sulfate and other nonglucuronide conjugates of bilirubin" *J. clin. Invest.* 38:645/1959
22. Jacob J.J.C. "The electrophoretic analysis of protein extracts from striated rabbit muscle" *Biochem. J.* 41:83/1947
23. Klatskin G., Bungards L. "Bilirubin-protein linkages in serum and their relationship to the van den Bergh reaction" *J. clin. Invest.* 35:537/1956
24. Lathe G.H. "The chemical pathology of bile pigments. Part I: The plasma bile pigments" *Biochem. Soc. Symposia* 12:34/1954
25. v. Leibnitz E. "Hisochemische Untersuchungen an Ablagerungen von Gallenfarbstoffen im ZNS" *Wiss.Z. Karl-Marx-Universität Leipzig. Mathem. Naturwiss. Reihe* 13:1:151/1964
26. Leidl L. Inauguraldissertation München 1969
27. Martin N.H. "Bilirubin-serum protein complexes" *Biochem. J.* 42 Proc. XV

28. Martin N.H. "Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXI Interactions with bilirubin" J. amer. Chem. Soc. 71:1230/1949
29. Nosslin B. Vortrag über Bilirubinmonoglucuronid, Int. Symposium "Der Icterus" Freiburg/Br. 1967
30. Nowy H. "Elektrophoretische Analysen von Herzmuskelproteinen" Materia Med. Nordmark 509/1965
31. Odel G.B. "Dissociation of bilirubin from albumin and its clinical implications" J. Pediat. 55:268/1959
32. Odell G.B. "Studies in kernicterus. I. The protein binding of bilirubin" J. Clin. Invest. 38:823/1959
33. Pedersen K.O., Waldenström J. "Studien über das Bilirubin in Blut und Galle mit Hilfe von Elektrophorese und Ultrazentrifugierung" Hoppe-Seylers Ztschr. physiol. Chemie 245:152/1937
34. Rutkowski R.B. "The determination of maximum bilirubin binding capacity of human albumin and serum by a calcium carbonate adsorption technique" Clin. Chim. Acta 17:31/1967
35. Scheiffarth F., Götz H., Schernthauer G. "Immuno-elektrophoretische Studien zur Frage der Identität menschlicher Organ- und Serumproteine" Clin. Chim. Acta 6:481/1961
36. Scheiffarth F., Götz H., Thuma G. "Immuno-elektrophoretische Studien zur Frage der Identität menschlicher Organ- und Serumproteine" Clin. Chim. Acta 7:355/1962

37. Schmid R. "Direct reacting bilirubin, bilirubin-glucuronide in serum, bile and urine" Science 124:76/1956
38. Schmid R. "The identification of "direct-reacting" bilirubin as bilirubin glucuronide" J. biol. Chem. 229:841/1957
39. Schmid R. "Interactions of Bilirubin with Albumin" Nature 206:1041/1965
40. Talafant E. "Properties and composition of the bile pigment, giving a direct diazo reaction" Nature 178:312/1956
41. Vietti T.J. "The in vivo crystallization of bilirubin in hyperbilirubinaemic infants" Kernicterus ed. by A. Sass-Kortsak University of Toronto Press 1961
42. Vogel S. "Studies on the pathogenesis of kernicterus" J. exp. Med. 98:509/1953
43. Vogel S. "Studies on the nature and deposition of kernicteris pigment" The American Journal of Pathology 29:582/1953
44. Waters W.J. "Protection against bilirubin by albumin" Kernicterus ed. by A. Sass-Kortsak University of Toronto Press 1961
45. Watson D. "The Transport of Bile Pigments: The Binding of Sodium Bilirubinate to Plasma Protein" Clin. Science 22:435/1962

46. Westphal U., Ott H., Gedigk P. "An welche Komponenten der Serumeiweißproteine ist das Bilirubin gebunden?" Hoppe-Seylers Ztschr. physiol. Chemie 285:200/1950
47. Zetterström R., Ernster L. "Bilirubin, an Uncoupler of Oxidative Phosphorylation in Isolated Mitochondria" Nature 178:1335/1956

LEBENS LAUF

Am 2.6.1944 wurde ich in Regensburg als Tochter des Ingenieurs Sigmund Scharnagl und seiner Frau Katharina, geb. Häupl geboren.

Von 1950 bis 1954 besuchte ich die Volksschule und von 1954 bis 1963 das humanistische Gymnasium in Amberg/Opf. Dort legte ich im Juni 1963 die Reifeprüfung ab.

Im November 1963 begann ich das Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen. Nach der naturwissenschaftlich-ärztlichen Vorprüfung im Frühjahr 1966 wurde ich an die Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München ummatrikuliert, wo ich 1969 das medizinische Staatsexamen ablegte.

Im August 1968 heiratete ich den Rechts-Referendar Willi Schmutterer.

Zur Zeit bin ich als Medizinalassistentin an der chirurgischen Abteilung des Knappschaftskrankenhauses Peißenberg tätig.

Herrn Prof. Dr. Nowy möchte ich meinen verbindlichsten Dank aussprechen für die Überlassung der Arbeit und für die wertvollen Hinweise und Ratschläge die er mir gab.

